

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**APOPTOZA I NE-APOPTOTIČKE VRSTE STANIČNE SMRTI**  
**PRILIKOM TUMORIGENEZE**

**APOPTOSIS AND NON-APOPTOTIC TYPES OF CELL DEATH**  
**DURING TUMORIGENESIS**

**SEMINARSKI RAD**

Veronika Burši

Preddiplomski studij Biologija

Undergraduate Study of Biology

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2018.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>3</b>
<b>2. APOPTOZA I MEHANIZMI APOPTOZE .....</b>	<b>4</b>
2.1. Intrinzični put: kaspazna kaskada i oštećenje mitohondrijske membrane .....	4
2.2. Ekstrinzični putevi: TNF i Fas .....	7
2.3. Regulacija ekspresije gena važnih za apoptozu .....	9
2.4. Ne-apoptotičke uloge kaspaza .....	10
<b>3. NE-APOPTOTIČKE VRSTE STANIČNE SMRTI .....</b>	<b>11</b>
3.1. Autofagija .....	11
3.2. Nekroza i nekroptaza .....	12
3.3. Piroptaza .....	14
3.4. Senescencija .....	14
3.5. Mitotička katastrofa .....	15
3.6. Anoikis .....	16
<b>4. NASTANAK TUMORA KAO POREMEĆAJA STANIČNOG CIKLUSA I STANIČNE SMRTI .....</b>	<b>18</b>
4.1. Mutacije trajne promjene DNA .....	18
4.2. Poremećaji staničnog ciklusa i tumorigeneza .....	19
4.3. Poremećaji i inhibicija stanične smrti prilikom tumorigeneze .....	20
4.4. Warburgov učinak .....	22
<b>5. IZAZIVANJE STANIČNE SMRTI U TUMORSKIM STANICAMA .....</b>	<b>24</b>
5.1. Klasične metode liječenja .....	25
5.2. Nove metode liječenja – ciljane protutumorska terapija .....	26
<b>6. SAŽETAK .....</b>	<b>28</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>29</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>30</b>
<b>MREŽNI IZVORI .....</b>	<b>33</b>

## 1. UVOD

Od samih početaka nastanka života na Zemlji pa sve do današnjih dana, "život" smo proučavali kroz nastanak i diferencijaciju stanica, odnosno formiranje jednostaničnih i višestaničnih organizama. Stanice koje su nastale, u određenome trenutku moraju i umrijeti, no ključno je pitanje zašto i kako se to događa. Naime, stanina smrt neophodna je sudbina svake žive stanice. Stanice umiru ili zato što su opasne ili zato što je potrebno manje energije da ih se ubije nego da ih se održava na životu. Stanina smrt najčešće nastupa kada stanice nisu više potrebne, kada su oštećene, postanu prestare (senescencija) ili se jednostavno u njima kreće događati nekakva promjena koja može biti potencijalno opasna za ostatak organizma (razvoj virusa, bakterija ili premaligni razvoj) (Duke et al., 1996). Apoptoza, koju su još 1972. godine Kerr i suradnici definirali kao programiranu staničnu smrt, izraz je koji se najčešće povezuje sa staničnom smrću iako to nije jedini i isključivi način na koji stanica može umrijeti. Već tada znanstvenici su je razlikovali od nekroze. Osim apoptoze i nekroze postoje i drugi načini na koje stanica može završiti svoje postojanje, a to su autofagija, nekroptoza, piroptoza, anoikis, mitotička katastrofa, senescencija i druge (Tait et al., 2014). No, je li uistinu bitno na koji način stanica umrijeti i kako ta saznanja mogu pomoći uvijek? Vrlo je bitno, jer što bolje poznamo načine na koje stanica može umrijeti, bolje možemo pristupiti problemu koji se javlja prilikom liječenja tumora, nekih neurodegenerativnih (npr. Alzheimer, Parkinson, Huntington) ili autoimunih bolesti (Hyman i Yuan, 2012). Primjerice, prilikom razvoja tumora transformirane stanice mogu biti otporne na određenu vrstu stanične smrti koju određeni lijek (induktor stanične smrti) kod njih izaziva (Henderson, 2003). Stoga je važno poznavati sve vrste stanične smrti kako bi prilikom liječenja tumora mogli izazvati određenu vrstu stanične smrti na koju taj tumor neće biti otporan (Tait et al., 2014).

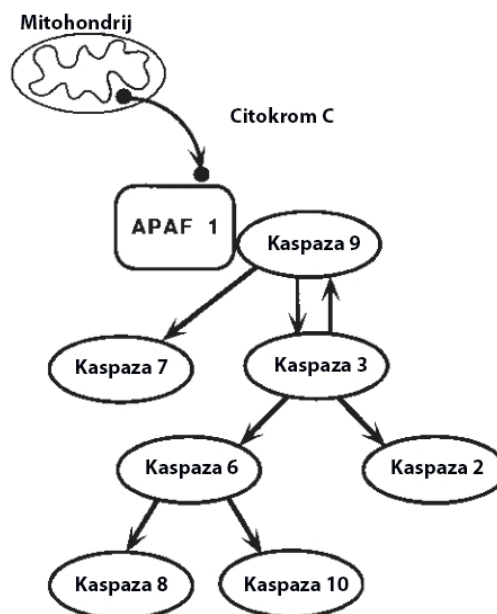
## 2. APOPTOZA I MEHANIZMI APOPTOZE

Apoptoza je proces stani ne smrti koji se zasniva na aktivnosti cisteinskih aspartat-specifi nih proteaza koje nazivamo kaspazama. Kaspaze postoje u citosolu kao neaktivni polipeptidni lanci – zimogeni koji su aktivirani proteoliti kim cijepanjem (Slee et al., 1999). Kod ovjeka postoji 12 okarakteriziranih kaspaza koje imaju ulogu u stani noj smrti, a možemo ih podijeliti na inicijatorske (vršne) kaspaze i efektorske (izvršiteljske) kaspaze. Inicijatorske kaspaze su sposobne za autokataliti ku aktivaciju, a efektorske za svoju aktivaciju trebaju inicijatorske kaspaze koje e izvršiti proteoliti ko cijepanje (Gewirtz et al., 2007). Njihova je funkcija dvojaka: važni su putu prijenosa signala stani ne smrti i, tako er, oni su enzimi koji efektivno izvršavaju degradaciju stani nih dijelova. Razlikujemo 3 faze apoptoze: i) induksijska faza (signali za indukciju apoptoze), ii) efektorska faza (centralni izvršitelj apoptoze je aktiviran, stanica je osu ena na smrt) i iii) faza razgradnje (Green i Kroemer, 1998).

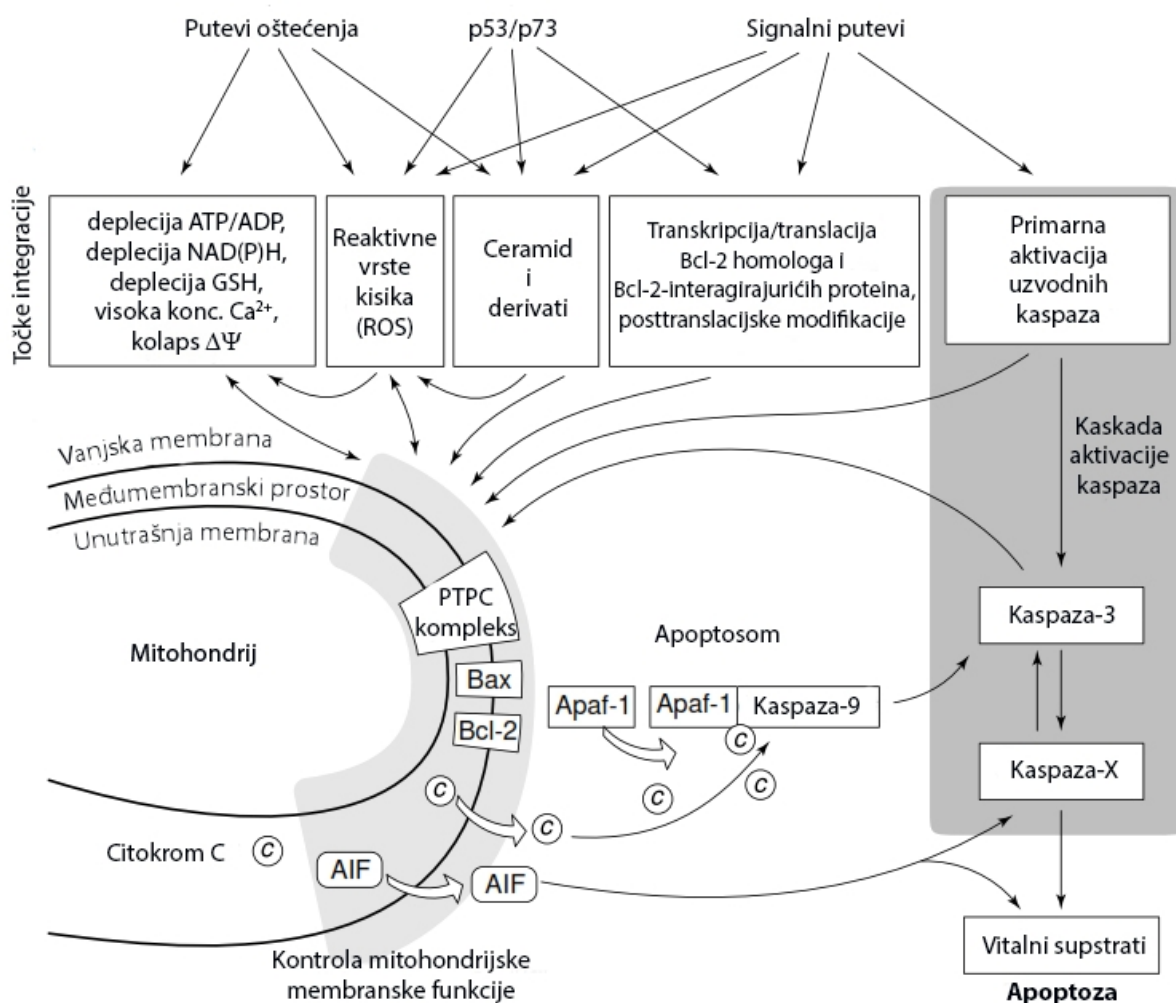
### 2.1. Intrinzi ni put: kaspazna kaskada i ošte enje mitohondrijske membrane

Znanstvenici Green i Kroemer, 1998. godine, predložili su model apoptoznog mehanizma i objasnili njegovu povezanost sa ošte enjem mitohondrija. Naime, tada najbolje okarakteriziran put aktivacije kaspazne kaskade je pomo u citokroma c (cyt c) u njegovoj holo-formi (mitohondijski intermembranski protein sa hem skupinom). Naime, rije je o intrinzi nom ili mitohondrijskom putu apoptoze (Gewirtz et al., 2007). U ovome putu citokrom c interagira sa APAF1 (eng. *Apoptotic protease activating factor 1*) koji je pak citoplazmatski protein sa N-terminalnom domenom za regrutaciju kaspaza (CARD), ATP-aznom domenom i cirkularnom solenoidnom domenom WD40 (Zhou et al., 2015). Osim vezanja citokroma c i dATP-a, Apaf-1 tvori oligomerni apoptosom. Dakle, apoptosom uklju uje povezivanje citokroma c i proteina Apaf-1 koji selektivno vežu prokaspazu-9 te ona proteoliti kim cijepanjem dobiva svoju aktivnu formu. Aktivna kaspaza-9 zatim aktivira itavu kaspaznu kaskadu, po evši od proteoliti kog cijepanja prokaspaze-3 i prokaspaze-7. Ovako aktivirana kaspaza-3 aktivira kaspaze-2, -6, -8 i -10 te sudjeluje u aktivaciji povratnom spregom (eng. *feedback loop*) kaspaze-9 (**Slika 1.**). Niti jedna druga kaspaza iz kaskade ne može biti aktivirana pomo u kompleksa Apaf-1/cyt c, osim prokaspaze-9 (Slee et al., 1999). Naime, kako bi došlo do ovakve kaskade koja dovodi do apoptoze, odnosno smrti stanice, mora biti otvoren

mitohondrijski mega-kanal, još se naziva i mitohondrijska propusna tranzicijska pora (eng. *mitochondrial permeability transition pore, MPTP*). Stani ni stres (izlazak  $\text{Ca}^{2+}$  iz ER ili reaktivnih vrsta kisika iz mitohondrija (eng. *reactive oxygen species, ROS*) i dr.) uzrokovat e izlazak citokroma c iz mitohondrija kroz mega-kanal u citoplazmu (**Slika 2.**). Ovaj poliproteinski kanal povezuje vanjsku i unutrašnju mitohondrijsku membranu te regulira propusnost mitohondrijske membrane. Ukoliko je mitohondrijski transmembranski potencijal ( $\Delta\psi_{\text{M}}$ ) iz nekog razloga narušen odnosno postoji nekakvo generalno ošte enje stanice (npr. zbog radijacije, toplinskog šoka (eng. *heat shock*) ili citotoksi nih lijekova, Slee et al 1999.) membrana mitohondrija koja ina e nije propusna za citokrom c, postaje za njega propusna i na taj na in ovaj protein dopijeva u citoplazmu (Marzo et al, 1998). Tako er, postoje i proteini iz porodice Bcl-2 ili Bcl-XL koji inhibiraju otvaranje mega-kanala (Green i Kroemer, 1998). Aktivacija kaspaza i narušavanje mitohondrijske membrane odvijaju se u cirkularnom sustavu povratne sprege (eng. *circular feedback loop*), tj. disfunkcionalni mitohondriji ispuštaju aktivatore kaspaza, a istovremeno kaspaze djeluju na fizi ko uništavanje mitohondrijske membrane (Green i Kroemer, 1998).



**Slika 1.** Shematski prikaz kaspazne kaskade nakon izlaska citokroma c iz mitohondrija i formiranja apoptosoma. Prilago eno na temelju Slee et al., 1999. u programu Adobe Photoshop CC 2017.



**Slika 2.** Shematski prikaz unutrašnjeg apoptoznog puta u stanicama sisavaca. Oštećenje stanice, dijelova ili aktivacija pro-apoptotičkih signalnih puteva može imati dva ishoda: i) preturbacija integriteta mitohondrijske membrane kroz aktivaciju megakanala, PTPC (eng. *permeability transition pore complex*) i/ili Bcl-2-Bax kompleksa u kontaktnom mjestu vanjske i unutrašnje mitohondrijske membrane ili ii) primarna aktivacija kaspazne kaskade. Otvaranje PTPC-a ima veliki utjecaj na energetske i metaboličke procese stanice i uzrokuje nakupljanje reaktivnih vrsta kisika (dvostruka strelica). Ispuštanje citokroma c prekida transporni lanac elektrona izmeđ u respiratornih kompleksa III i IV (nisu prikazani), što ugrožava proces staničnog disanja u mitohondrijima i uzrokuje nakupljanje superoksidnih aniona. Prilagođeno na temelju Green i Kroemer, 1998. u programu Adobe Photoshop CC 2017.

Osim apoptozne kaspazne kaskade ovisne o izlasku citokroma c iz mitohondrija, postoji i kaspazna kaskada potaknuta stresom endoplazmatskog retikuluma (ER) koja se tako može dovesti do apoptoze stanice (Morishima et al., 2002). Kako bi u potpunosti izolirali apoptozni put u kojem do smrti stanice dolazi isključivo zbog stresa u ER (o ovome putu također može doći do otpuštanja citokroma c u citosol), Morishima i suradnici 2002. godine koristili su mišje mioblaste, staničnu liniju C2C12. Došli su do zaključka kako toksični stres za ER, poput: tunicamicina (inhibitor glikozilacije), tapsigargina (inhibitor ER-specifične kalcijeve ATP-aze) ili kalcijjskih ionopora, može izazvati aktivaciju porokaspaze-12 koja se u svojoj aktivnoj formi zatim aktivira prokaspazu-9. Dalje se nastavlja ista kaspazna kaskada kao u mitohondrijskom apoptoznom putu (Morishima et al., 2002).

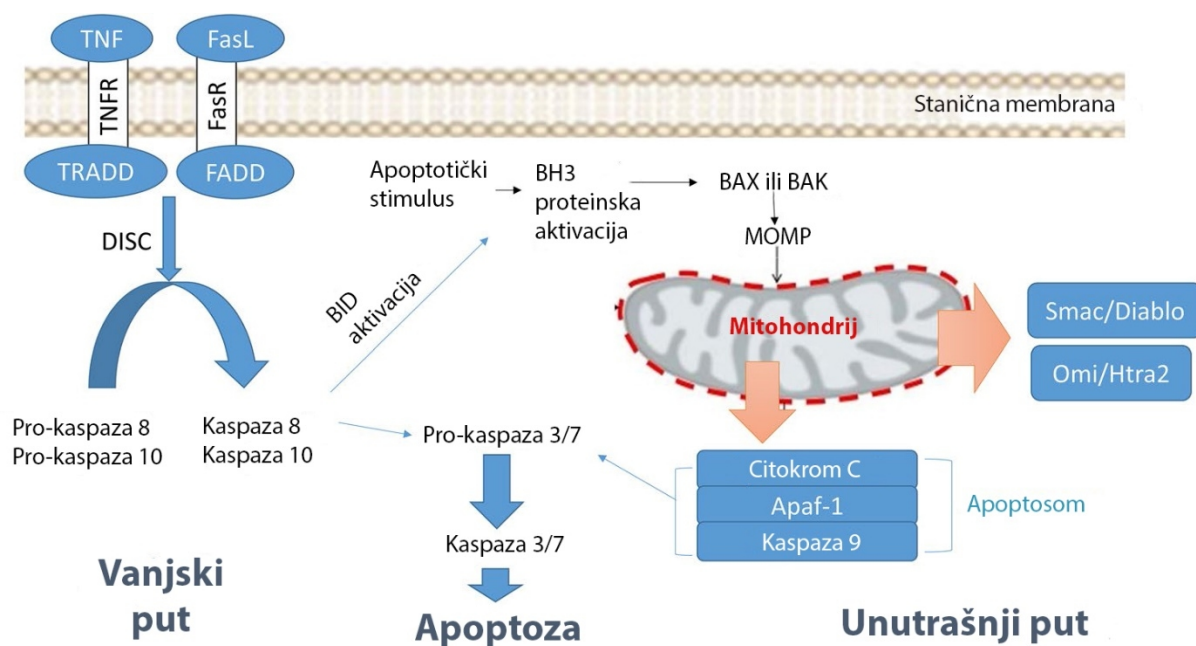
## 2.2. Ekstrinzični putevi: TNF i Fas

Pro-upalni citokin TNF (eng. *tumor necrosis factor*) otpuštaju brojne stanice imunološkog sustava poput monocita, makrofaga, limfocita T, limfocita B i NK (eng. *natural killer*) stanica. Ovi se citokini mogu otpuštati u upalnim stanjima poput bakterijskih infekcija ili pak za vrijeme dugotrajnijih patoloških stanja kao što su autoimune i neurodegenerativne bolesti ili tumori. Većina stanica u ljudskom tijelu ima 2 vrste receptora TNF-R1 i TNF-R2. U nekim od gore opisanih patoloških stanja stanica više nije sposobna kvalitetno obavljati svoju funkciju stoga vezanjem pro-upalnih citokina za svoje receptore na površini stanica, TNFR (eng. *tumor necrosis factor receptor*) mijenjaju njihovu konformaciju i aktiviraju različite stanične proteine ka jednom cilju – apoptozi. S obzirom na to koji proteini su u kontaktu sa TNFR, može se pokrenuti apoptoza preko kaspazne kaskade ili neovisno o njoj (Gewirtz et al., 2007).

Receptor Fas (eng. *first apoptosis signal*) je transmembranski protein iz porodice TNF proteina na koji se veže Fas ligand (FasL). Vezanjem ovog liganda i njegovog receptora Fas u kompleks formira se kompleks DISC (eng. *death-inducing signaling complex*) koji sadrži domenu FADD (eng. *Fas-associated death domain*), kaspazu-8 i kaspazu-10 (Gewirtz et al., 2007). S obzirom na kaskadu događaja dalje u stanici, same stanice karakteriziramo u dva tipa. U tipu I stanica ovako aktivirana kaspaza-8 aktivira ostale kaspaze u kaskadi i u konačnici dolazi do apoptoze stanice. U stanicama tipa II kompleks Fas-DISC započinje ciklus pozitivne povratne sprege kojim povećava otpuštanje pro-apoptotičkih faktora iz mitohondrija i pojačano aktivira kaspazu-8 (Berry, 2007).

S obzirom na to da su vanjski i unutrašnji apoptozni put u stanicama jako isprepleteni, važno je opisati i njihovu međusobnu povezanost preko aktivacije kaspaza-3 i -7. (Slika 3.). Prvi korak u inicijaciji vanjskog apoptoznog puta je vezanje liganda smrti (eng. *death ligand*) na njegove receptore u plazmatskoj membrani: protein TNF sa TNF receptorom (eng. *tumor necrosis factor receptor, TNFR*) i Fas ligand sa Fas receptorom (FasR). Ovaj događaj popraćen je vezanjem TNF receptor-asocirane domene smrti (eng. *TNF receptor-associated death domain, TRADD*) i/ili vezanjem FADD (eng. *Fas-associated death domain protein*) za unutarstanične domene receptora smrti (eng. *death receptors*). Ove reakcije rezultiraju formiranjem DISC-a (eng. *death-inducing signaling complex*) koji promovira aktivaciju pro-kaspaze 8 i 10. Jednom kada ove kaspaze postignu svoju aktivnu konformaciju, one ili aktiviraju efektorske kaspaze -3 i -7 što rezultira apoptozom ili konvergira u unutrašnji put aktivacijom proteina BID-a (mitohondrijska amplifikacijska petlja). BID je pro-apoptotički protein sa domenom BH3 koji ima sposobnost vezanja proteina BCL-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) ili proteina BAX (eng. *BCL2 associated X protein*) i promovira staničnu smrt. Unutrašnji put je započet kao odgovor na pro-apoptotičke stimulanse koji aktiviraju pro-apoptotičke proteine iz BCL2 porodice: *BH3-only* proteine. BAX i/ili BAK su posljedično aktivirani i uzrokuju permeabilizaciju vanjske mitohondrijske membrane (eng. *mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP*). Različiti proteini su tada ispušteni iz mitohondrija: Smac/Diablo (eng. *mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 (eng. *Omi stress-regulated endoprotease/High temperature requirement protein A2*) i citokrom c. Citokrom c zajedno sa proteinom Apaf-1 i pro-kaspazom 9 formira apoptosom. Apoptosom tada inducira aktivaciju kaspaze 9 koja zatim aktivira kaspaze kaspaze-3 i -7, što u konačnici dovodi do apoptoze (Mohamed et al., 2017).





**Slika 3.** Shematski prikaz vanjskog i unutrašnjeg apoptoznog puta te njihova međusobna povezanost. Prilagođeno na temelju Mohamed et al., 2017. u programu Adobe Photoshop CC 2017.

### 2.3. Regulacija ekspresije gena važnih za apoptozu

Otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citosol primarno je regulirano skupinom proteina Bcl-2 koja se sastoji od pro- i anti-apoptičkih proteina (de Bruin i Medema, 2008). Visoka ekspresija gena *Bcl-2* inhibira staničnu smrt. Karakterizirano je 20 polipeptidnih lanaca ove porodice u sisavaca koje s obzirom na njihovu strukturu i funkciju možemo podijeliti u 3 skupine. Skupina I uključuje Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, Nrf3, Bcl-B i druge. Skupina II uključuje Bax, Bak i Bok/Mtd, te skupina III: Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk i još neke druge polipeptide. Članovi skupine II, osobito proteini Bax i Bak (eng. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) direktno utječu na izlazak citokroma c iz mitohondrija. Primjerice protein Bax je labavo vezan za mitohondrijsku površinu u ne-apoptičkim stanicama, ali se u slučaju vanjske mitohondrijske membrane izlaganjem stanice nekom apoptotičkom stimulansu prijemno oligomerizira kako bi napravio poru u membrani i mijenja svoju konformaciju. Skupina III polipeptida djeluje na način da olakšava ugradnju članova skupine II u membranu i neutralizira učinak članova skupine I koji imaju anti-apoptički učinak (Kaufmann, 2007).

S obzirom da članovi porodice proteina Bcl-2 reguliraju apoptozu u reakcijama koje prethode nastajanju apoptosoma, ovaj mitohondrijski put reguliran je i nakon formiranja apoptosoma i to proteinskim inhibitorima apoptoze (eng. *IAP family*) (Kaufmann, 2007).

## 2.4. Ne-apoptotičke uloge kaspaza

Kaspaze, cisteinske aspartat-specifične proteaze, osim sudjelovanja u procesu stanične smrti imaju vrlo važnu ulogu u diferencijaciji i proliferaciji stanica. Aktivirane kaspaze igraju vrlo važnu ulogu za vrijeme proliferacije primjerice limfocita T, a uključene su u najrazličitije procese stanične diferencijacije poput enukleacije eritrocita i keratinocita kože. U nekim stanicama, njihovu diferencijaciju možemo vidjeti kao morfološki nepotpunu apoptozu. Nadalje, jedno od istraživanja *knock-out* miševa za kaspazu-3, pokazalo su važnost ove kaspaze u diferencijaciji skeletnog miša a s obzirom da su primarni mioblasti kaspaznog-3 *knock-out* miša pokazali nedostatke miotubulne i miofibrilne formacije kao i redukciju mišićno specifične ekspresije gena (Schwerk, 2003).

### 3. NE-APOPTOTI I NJIHOVE VRSTE STANI NE SMRTI

Jedna od glavnih odlika tumorskih stanica jesu poremećaji u putevima stanin ne smrti. Iako je otpornost stanica na apoptozu usko povezana sa tumorigenezom, odnosno otpornoš u na protutumorske lijekove, smrt u tumorskim stanicama može biti inducirana i ne-apoptotičkim mehanizmima kao što su: nekroza, senescencija, autofagija i mitotička katastrofa (Okada i Mak, 2004). Iako je u stanicama gotovo nemoguće razdvojiti ove i druge oblike stanin ne smrti jer se nerijetko pojavljuju zajedno i isprepliću. U terapijskom kontekstu važno je poznavati različite oblike stanin ne smrti kako bi primjerci mogli izazvati staninu smrt u tumorskim stanicama koje su "otporne" na apoptozu (Tait et al., 2014).

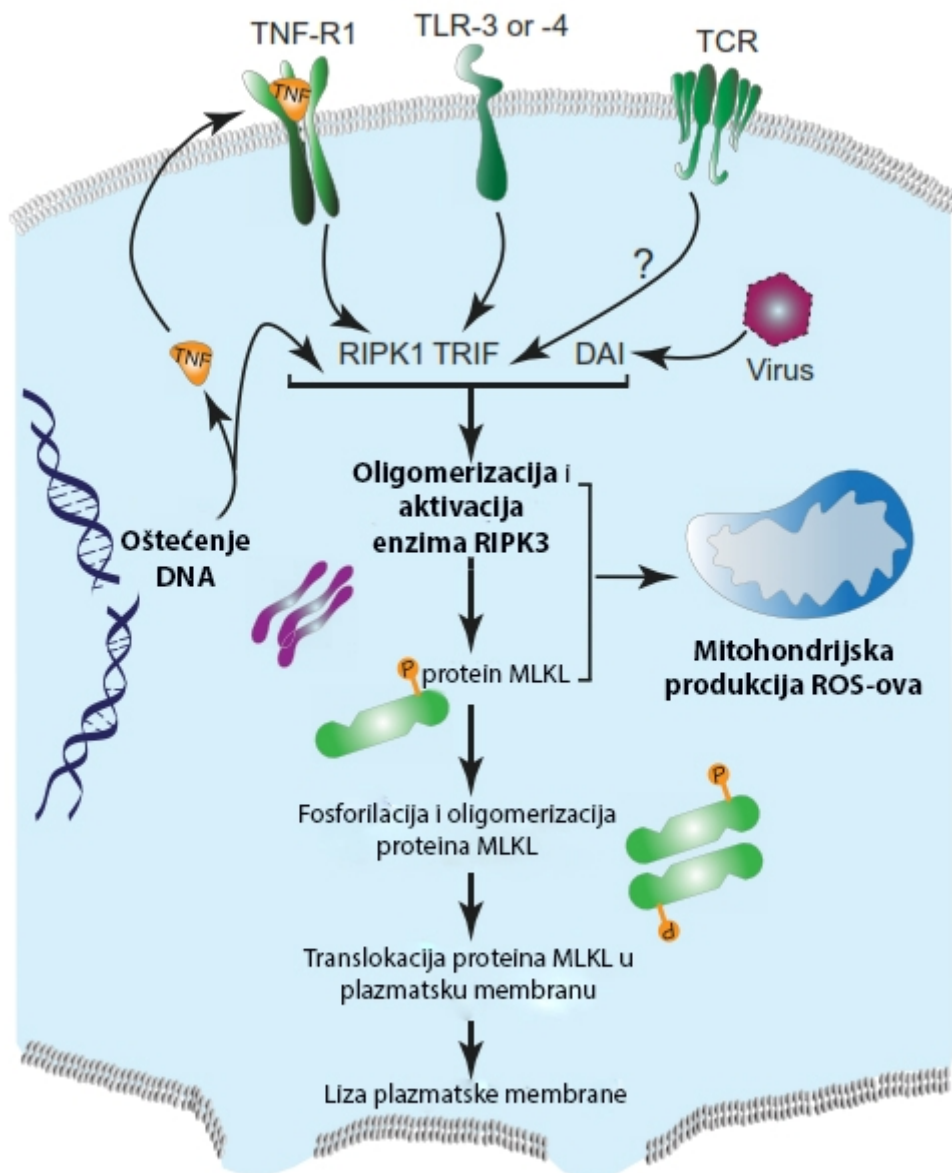
#### 3.1. Autofagija

Autofagija je vrsta stanin ne smrti koja se morfološki i funkcionalno razlikuje od apoptoze. Karakterizira ju formiranje staninih vezikula (mogu sadržavati i citotoksične organele) koje se stapaju s lizosomima. Ovakvim stapanjem formiraju se autofagosomi, dvostrukom membranom obavijene vezikule u kojima sadržaj razgrađuju lizosomalne proteaze (de Bruin i Medema, 2008). Jedan od važnih proteina za autofagiju je Beclin-1 za koji je pronađeno da je u brojnim tumorima slabo eksprimiran. Također, prilikom stanin ne smrti protein Beclin-1 može interagirati sa proteinom Bcl-2, koji je važan u apoptozi (Marquez i Xu, 2012). Uloge autofagije su brojne, primjerice: unutarstanino iščišćenje organela i proteina, adaptacija na izgladnjivanje stanica, eliminacija mikroorganizama, stanina smrt, supresija tumorskog razvoja u ranim stadijima i prezentacija antigena. Autofagija može spriječiti razvoj normalne stanice u tumorsku, razgradnjom organela jer reducira oksidacijski stres ili razgradnjom specifičnih proteina koji promoviraju formiranje tumora (de Bruin i Medema, 2008).

### 3.2. Nekroza i nekroptoza

Nekroza je nekontrolirani oblik stani ne smrti stoga se razlikuje od nekroptoze koja je, poput apoptoze, kontrolirani oblik stani ne smrti (Tait et al., 2014). Nekroza je naj eš e rezultat patofiziološkog stanja kao što su infekcije, upale ili ishemija. Ovakva trauma odnosno stres za stanicu uzrokuju neuspjeh u obavljanju normalnih fizioloških puteva koji su klju ni za održavanje homeostaze kao što su održavanje osmotske ravnoteže, membranski transport i proizvodnja energije (Okada i Mak, 2004). Nekrozu morfološki karakterizira vakuolizacija citoplazme, gubitak membranskog integriteta i otjecanje stanice. Ovakve pojave esto rezultiraju otpuštanjem stani nih odjeljaka u mikrookoliš stanice što može izazvati imunološki odgovor organizma (de Bruin i Medema, 2008).

Smatra se kako se nekroptoza evolucijski razvila kao obrambeni mehanizam stanice u trenutcima kada se iz nekog razloga ne može aktivirati apoptozni mehanizam stani ne smrti, primjerice zbog virusnih inhibitora apoptoze. Baš kao i kod nekroze dolazi do "curenja" stani nog sadržaja u okoliš, ali je permeabilizacija stani ne membrane regulirana. Primarno izvanstani ni stimulans poput proteina TNF veže se na TNF receptor i mijenja njegovu konformaciju aktiviraju i domenu stani ne smrti TRADD (eng. *TNF receptor-associated death domain*) koja regrutira enzim RIPK1 (eng. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) te u odsutnosti aktivnih kaspaza ovaj enzim i enzim RIPK3 transfosforiliraju jedan drugoga, ime se formira nekrosom. Nekrosom fosforilacijom aktivira pro-nekroptoti ki protein MLKL (eng. *mixed lineage kinase domain-like protein*). Ovaj doga aj dovodi do produkcije reaktivnih vrsta kisika (ROS) od strane mitohondrija. Protein MLKL je taj koji e izazvati nastanak nekroznog fenotipa i omogu iti "curenje" stani nog sadržaja u okoliš tako što e se ugraditi u stani nu membranu (**Slika 4.**). Ovakve signale e stanice imunološkog sustava prepoznati kao odobrenje za fagocitozu (npr. makrofazi) (Berghe, 2014 i Tait et al., 2014 i).



**Slika 4.** Mehanizam RIPK3-posredovane nekroptoze. Prilagođeno na temelju Tait et al., 2014. u programu Adobe Photoshop CC 2017.

### 3.3. Piroptoza

Piroptoza, kao što njeno ime sugerira, upalna je vrsta stani ne smrti. Piroptoza je ovisna o kaspazama, ali se u mnogo emu razlikuje od apoptoze. Za razliku od apoptoze, ovisi o aktivaciji kaspaze-1 (još se naziva i pro-inflamatorna kaspaza) ili kaspaze-5 (kod ljudi). Kaspazu-1 aktivira struktura koju nazivamo inflamatom, a koja se formira kao odgovor na detektirane bakterijske toksine ili viralnu RNA u zaraženim stanicama. Uloga kaspaze-1 je procesiranje inaktivnih interleukina (IL- ) i interleukina 18 (IL-18) u zrele upalne (inflamatorne) citokine. Na ovaj na in aktivirani upalni citokini signaliziraju stanicama imunološkog sustava gdje je u tijelu došlo do infekcije. Permeabilizacija mitohondrijske membrane se obično ne događa za vrijeme piroptoze. Piroptozu morfološki karakteriziraju: fragmentacija DNA, otjecanje stanice i liza plazmatske membrane. Pore u membrani najčešće nastaju kao odgovor na bakterijske infekciju ili toksine (Tait et al., 2014).

### 3.4. Senescencija

Senescencija ili biološko starenje je proces koji opisuje limitiranost zdravih somatskih stanica da se beskonačno dijele (Hayflickov limit). Poznajemo dvije osnovne vrste senescencije koje ograničavaju beskonačnu proliferaciju stanica: replikativna senescencija i stresom-inducirana senescencija (SIS). Kod replikativne senescencije DNA polimeraza ne može vjerno replicirati krajeve kromosoma, što dovodi do progresivnog gubitka telomernih DNA sekvenci sa svakom sljedećom staničnom diobom i signalizira se zaustavljanje staničnog rasta. Postoje najmanje dva mehanizma koja sprječavaju daljnje skraćivanje telomera, a za posljedicu imaju nadvladavanje replikativne senescencije. To se postiže reaktivacijom telomeraze ili alternativnog metaboličkog puta za produljivanje telomera (eng. *alternative lengthening for telomeres pathway*, ALT). Nadalje, stresom inducirana senescencija je izazvana: oštećenjem DNA ili kromatinske strukture, oksidacijskim stresom i aktivacijom onkogeni. Ovakvi i drugi stresori aktiviraju signale za zaustavljanje rasta stanice. Upravo sposobnost zaustavljanja staničnog rasta kao posljedica skraćivanja telomera ili staničnog stresa je esencijalna svojstvo koje razlikuje normalne smrtno stanice i besmrtno tumorske stanične linije (*in vitro*). Na ovaj način nastale tumorske stanice izbjegle su kritičnu točku zaustavljanja rasta i nastavile se dijeliti izmijenjene. U normalnim zdravim stanicama telomeraza najčešće nije aktivna ili je vrlo slabo aktivna, upravo zbog toga je broj dioba stanice ograničen. Aktivna telomeraza

pronađena je u većini primarnih tumora što im omogućuje dugoročan rast. (Ramirez, 2007 i Nelson i Cox, 2013).

Kako bi stanica ušla u proces senescencije potrebna je aktivacija različitih inhibitora staničnog ciklusa, što uključuje ekspresiju i aktivnost tumorskih supresora poput proteina: p53, p21, p16 i RB (retinoblastoma protein). Uključenost ovih tumorskih supresora ukazuje da je jedna od glavnih funkcija senescencije suprimiranje tumorigeneze što je i dokazano na animalnim modelima (Okada i Mak, 2004).

### 3.5. Mitotička katastrofa

Mitotička katastrofa (MK) je vrsta stanične smrti koja je uzrokovana aberantnom mitozom (aberrantnom segregacijom kromosoma), a najčešće se događa zbog nedostataka pri kontrolnim točkama staničnog ciklusa. Kontrolna točka G2/M (eng. *checkpoint*) staničnog ciklusa je odgovorna za blokiranje mitoze u slučajevima oštećene DNA, a proteini p53 i p21 mogu igrati važnu ulogu u prevenciji mitotičke katastrofe (de Bruin i Medema, 2008). Prelazak iz M u G2 fazu staničnog ciklusa visoko je kontroliran kinazom Cdc2 (eng. *cyclin-dependent protein kinase Cdk1/Cdc2*). Aktivacija kontrolne točke G2 događa se ako su senzorne molekule ATM (eng. *ataxia teleangiectasia mutated*) ili ATR (eng. *Rad3-related*) detektirale oštećenje molekule DNA (Okada i Mak, 2004). Do mitotičke katastrofe može doći i zbog oštećenja mikrotubula ili diobenog vretena. Stanice koje prežive abnormalnu mitozu mogu se potencijalno asimetrično dijeliti što dovodi do nastanka aneuploidnih i poliploidnih stanica koje su uglavnom više tumorigene. Survivin je protein iz porodice proteina inhibitora apoptoze (eng. *Inhibitor of Apoptosis Proteins, IAP*) čija je ekspresija povezana sa proliferacijom tumorskih stanica i nemogućnošću u istih da se dogodi mitotička katastrofa. Ukoliko znamo da oštećenje DNA dovodi do mitotičke katastrofe, možemo modelirati protutumorsku terapiju koja će dovesti do oštećenja DNA (npr. djelovanje doksorubicinom ili radioterapijom na tumorske stanice) i izazvati mitotičku katastrofu u tim stanicama (de Bruin i Medema, 2008).

Defekt u genima potrebnim za induciranje mitotičke katastrofe može pridonijeti tumorigenezi. Ovi geni kodiraju za brojne kinaze koje sudjeluju u regulaciji mitoze, poput: PLK1 (eng. *polo-like kinase 1*), porodica aurora kinaza (aurora-A i aurora-B), i regulatori kontrolnih točaka diobenog vretena BUBR (eng. *BUB-related kinase*) (Okada i Mak, 2004).

Stanice koje su preživjele mitoti ku katastrofu možemo povezati i sa nakupljanjem ciklina B u ranim fazama mitoze, što nije karakteristično za normalne mitotičke događaje. Stanice koje prežive MK moraju uspostaviti svoju klonogenost, a smatra se da to čine kroz mehanizme mejoze da bi se dobile kvazi-diploidne stanice ne frakcije od poliploidnih parentalnih populacija. Mehanizmi promjene iz pro-mitotičkog u pro-mejotički način diobe nisu još posve znanstveno razjašnjeni (Ianzini i Mackey, 2007).

### 3.6. Anoikis

Anoikis (prema grčkom: gubitak doma, beskućnik) oblik je programirane stanične smrti koja se aktivira u trenutku kada stanica više nije povezana sa izvanstaničnim matriksom ili stanicama koje ju okružuju. Proteini integrini povezuju citoskelet stanice sa proteinima izvanstaničnog matriksa (ISM), a važni su za prenošenje signala iz ISM u stanicu, migraciju stanica, proliferaciju i preživljavanje (Paoli et al., 2013). Za međusobno povezivanje stanica važni su kadherini, skupina transmembranskih glikoproteinskih adhezijskih molekula (Grossmann, 2002). Anoikis je važan obrambeni mehanizam organizma u prevenciji kako se odvojene stanice ne bi usidrile na drugim lokacijama u organizmu i započele displastični rast i abnormalnu diferencijaciju. Deregulacija anoiksa odlika je tumorskih stanica koja pridonosi metastaziranju u distalne organe od mjesta nastanka primarnog tumora (Paoli et al., 2013). Pojava ekspresije onkogeno kao što su *RAS*, *RAF*, *RAC* i *SRC* i delecija tumor supresorskih gena poput *PTEN* (fosfataza i tenzin homolog) i *P53* utječu na stanice tako da postanu rezistentne na anoikis (Grossmann, 2002).

Anoikis je usko povezan sa apoptozom zato jer je kaspazna kaskada također aktivirana u ovom obliku stanične smrti, a ona kulminira aktivacijom endonukleaza i fragmentacijom DNA. Anoikis se odvija aktivacijom vanjskog i unutrašnjeg apoptoznog puta, a uključeni u oba su članovi porodice proteina Bcl-2. Važno je da u ovim apoptoznim putevima dođe do aktivacije kaspaze-3 koja će pokrenuti daljnju proteolitičku kaskadu. Dolazi do cijepanja kinaze FAK (eng. *focal adhesion kinase*) i proteina p130Cas (SH2/SH3 adaptorski protein). Cijepanjem kinaze FAK narušava se fokalna adhezijska arhitektura i inhibira se signal za preživljavanje. Protein p130Cas se povezuje s kinazom FAK i prenosi integrinske signale, a nakon što je proteolitički pocijepan djelovanjem kaspaza, narušena mu je stanična lokalizacija i interakcija sa paksilinom (protein čija je funkcija povezivanje stanica sa izvanstaničnim



matriksom). Nadalje, cijepanjem proteina p130Cas nastaje C-terminalni fragment koji inhibira transkripciju p21Waf1/Cip1 (inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima, (Weiss, 2003)), ime se pridonosi inhibiciji stani nog ciklusa. Narušavanje citoskeleta dovodi do odvajanja stanice od stani nog matriksa, a tako er može pridonijeti indukciji anoikisa otpuštanjem pro-apoptotičkih faktora kao što je Bim i receptora stani ne smrti kao što je Fas iz sekvestriranog stanja (Paoli et al., 2013).

## 4. NASTANAK TUMORA KAO POREMEĆAJA STANIČNE CIKLUSA I STANIČNE SMRTI

Jedna od glavnih karakteristika tumorskih stanica jesu poremećaji u putevima stanične smrti (Okada i Mak, 2004). U većine tumora dolazi do mutacija u genima koji su važni za staničnu smrt ili za održavanje normalnog rasta i diobe stanice (Cassier et al., 2017). U sisavaca postoji visoka korelacija između akumulacije mutacija i nastanka tumora, a glavni uzroci su promjena u stanicama je oksidativni stres (Nelson i Cox, 2013). Održavanje integriteta genoma osigurano je različitim mehanizmima za popravak DNA i/ili odlaskom nevijabilnih stanica u apoptozu ili senescenciju. Multifunkcionalni fosfoproteini MYC uključeni su u progresiji staničnog ciklusa, apoptozi i staničnoj transformaciji, a promijenjeni su u većine humanih tumora (Maclean i Cleveland, 2007). Proteini inhibitori apoptoze (IAP) su skupina apoptoznih regulatora važnih u kontroli aktivacije kaspaza, preživljavanju stanice i kontroli stanične smrti. (Mohamed et al., 2017). Nastanak tumora uzrokuje poremećaje i u energetskeg metabolizmu stanica pa tako primarni metabolički put za dobivanje energije postaje glikoliza, a unos glukoze je udeseterostručen u odnosu na zdrave stanice (Nelson i Cox, 2013).

### 4.1. Mutacije trajne promjene DNA

Brojne tvari u hrani, vodi ili zraku mogu utjecati na promjene u molekuli DNA. Oštećenje ili nasumična promjena u molekuli DNA su vrlo opasni. Ukoliko ih stanični mehanizmi za popravak ne prepoznaju kao takve te ako se nastala promjena replicira i prenese na sljedeće generacije ona postaje trajna. Trajne promjene nukleotidne sekvence u molekuli DNA nazivamo mutacije. Mutacije, s obzirom na svoj utjecaj na organizam, mogu biti neutralne, delecijske i korisne (Nelson i Cox, 2013). Najčešće mutacije koje se u prirodi događaju su neutralne, a najmanje je korisnih mutacija, promatrano sa evolucijskog stajališta (Losos, 2013). Uzroci oštećenja DNA mogu biti: UV-zračenje, ionizirajuće zračenje, konzervansi (u tijelu se metaboliziraju na do nitrita i nitrata te disulfida koji deaminiraju dušične baze u DNA), alkiliraju i agensi (eng. *nitrogen mustard* koji se koristio kao bojni otrov). No, najvažniji uzroci promjena u stanicama je oksidativni stres. Zbog aerobnog metabolizma u mitohondrijima nastaju reaktivne vrste kisika (ROS) poput vodikovog peroksida, superoksidnih radikala i njima sličnih koji mogu oštetiti stanicu i njene dijelove. Stanica, kako

bi se zaštitila, posjeduje enzime poput katalaze i superoksid dismutaze koji ovakve ROS vrste pretvaraju u bezopasne spojeve poput vode i kisika (Nelson i Cox, 2013).

U sisavaca postoji velika korelacija između akumulacije mutacija i nastanka tumora. U ljudi dolazi do nastanka tumora kada geni koji reguliraju normalnu staničnu diobu (proto-onkogeni i tumor supresorski geni) postanu disfunkcionalni, aktivirani su u krivo vrijeme ili su izmijenjeni. Kao posljedica toga stanice nekontrolirano rastu i formiraju tumore. Nadalje, promjene u genima koji sudjeluju u mehanizmima popravka DNA poput mehanizma za izrezivanje nukleotida (eng. *nucleotide excision repair*, *NER*), popravak rekombinacijom, popravak krivo ugrađenih nukleotida nakon replikacije (eng. *mismatch repair*) i sklonost DNA polimeraze da napravi grešku tijekom replikacije može također doprinijeti nastanku tumora. Primjerice kod žena, razvoj raka dojke u većini slučajeva se povezuje sa naslijeđenim defektom dva gena *BRCA1* (eng. *breast cancer 1*) i *BRCA2* (eng. *breast cancer 2*) koji kodiraju za velike istoimene proteine. Ovi proteini djeluju sa drugim proteinskim kompleksima uključenim u transkripciju, održavanje strukture kromatina, popravak DNA i kontrolu staničnog ciklusa, a ukoliko su izmijenjeni dolazi i do promijene u njihovoj funkciji (Nelson i Cox, 2013).

#### 4.2. Poremećaji staničnog ciklusa i tumorigeneza

Nemogućnost kontrole staničnog rasta i inhibicija apoptoze glavne su značajke nastanka tumora. Porodica onkogenih *MYC* uključuje u tumorigenezi i izmijenjena u većine poznatih tumora. Skupina gena *MYC* kodira za proteine, transkripcijske faktore, koji se specifično vežu na određene sekvence u DNA, a koje prepoznaju pomoću svojih domena za interakciju sa DNA (zavojnica-okret-zavojnica-leucinski zatvarač). Ti su proteini multifunkcionalni fosfoproteini koji igraju ključnu ulogu u progresiji staničnog ciklusa, apoptozi i staničnoj transformaciji. Mutirana verzija gena *MYC* je pronađena u 70% humanih tumora, a tada ovaj gen ima konstitutivnu ekspresiju. Kod ljudi gen *MYC* se nalazi na 8. kromosomu i regulira 15% ekspresije gena vezanjem na pojačivačke (eng. *enhancer*) sekvence ili regrutiranjem histonskih acetiltransferaza. Visoka razina ekspresije onkoproteina *MYC* utječe na nekontroliranu staničnu proliferaciju, povećava ukupnu masu stanica, biogenezu ribosoma, inhibira terminalne diferencijacijske programe i potiče angiogenezu. Nasuprot tome, u zdravim stanicama visoka razina ekspresije proteina *MYC* izazvati apoptozu. Onkoproteini *MYC*, između ostalog, utječu i na regulaciju ekspresije gena inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima (eng. *cyclin*-

*dependent kinase inhibitor, CDK inhibitor*). Dvije najveće skupine inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima su Ink4 i Cip/Kip te ih smatramo tumor supresorima. Gen *INK 4* je metiliran, odnosno na bilo koji drugi način može biti utišan ili izgubi svoju pravu funkciju u većine ljudskih tumorskih stanica. Cip/Kip je nešto veća skupina proteina te do sada nije opaženo da su svi proteini iz ove skupine istovremeno promijenjeni u tumorskih stanicama, iako je primjerice niska ekspresija proteina p27<sup>Kip1</sup> iz porodice proteina Cip/Kip opažena u velikom broju tumora. Protein Myc je povezan sa regulacijom ekspresije gena inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima i ima sposobnost inhibicije ekspresije gena za protein p27<sup>Kip1</sup>. Dakle, put Myc-p27<sup>Kip1</sup> je važna meta u prevenciji i liječenju tumora, kao i drugi CDK inhibitori (Coqueret, 2003, Canepa et al., 2007, Maclean i Cleveland, 2007).

### 4.3. Poremećaji i inhibicija stanične smrti prilikom tumorigeneze

U većine tumora dolazi do mutacije ili epigenetskog poremećaja u genima koji su važni za održavanje normalnog rasta i diobe stanice ili u genima koji su važni za staničnu smrt. Ciljanje na apoptoznu mašineriju je važno za liječenje tumora, pogotovo leukemija. U većini slučajeva cilj je eliminirati tumorske stanice reaktivacijom puteva stanične smrti. To možemo učiniti tako što ciljamo na anti-apoptozne proteine kao što su protein Bcl-2 i skupina proteina inhibitora apoptoze (IAP) ili pak reaktivacijom p53 odgovora. Jedan od glavnih regulatora apoptoze je tumor supresor p53. Protein Bcl-2 i ostali članovi porodice proteina Bcl-2 su jako eksprimirani u tumorigenim stanicama, induciraju transformaciju blokiranjem apoptoze. Primjerice, kod akutne mijeloidne leukemije njihova ekspresija korelira s otpornošću na citotoksičke kemoterapeutike (Cassier et al., 2017).

Proteini inhibitori apoptoze (IAP) su skupina apoptoznih regulatora koji su važni u kontroli preživljavanja i stanične smrti tako što kontroliraju signalne puteve aktivacije kaspaza i NF- $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) signalne puteve. Ova porodica proteina kod čovjeka uključuje čak sedam do sada otkrivenih proteina (IAP1, IAP2, XIAP, IAP-u sličan protein 2, Survivin, Livin, BRUCE/Apollon). Proteini IAP su jedini poznati endogeni proteini koji mogu suprimirati inicijatorske i efektorske kaspaze. Skupina proteina IAP imaju karakterističnu N-terminalnu domenu BIR (eng. *Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat, or BIR*) čija se srž sastoji od domene cinkovih prstiju. Upravo domena BIR ovih proteina zaslužna je za vezanje na aktivno mjesto kaspaza i inhibiciju njihove

proteolitičke aktivnosti. Također, neki proteini iz ove porodice sposobni su označiti efektorske kaspaze za ubikvitinizaciju pa ih time predodređuju za proteasomalnu razgradnju. Nadalje, proteini IAP mogu inhibirati apoptozni signalni put TNF i aktivirati signalne puteve za preživljavanje NF- $\kappa$ B. Primjerice visoka ekspresije Survivina povezuje se sa nemogućnošću stanice da izazove smrt te promoviranjem angiogeneze. Poznato je kako upravo protein Survivin regulira ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) čime se povećava proliferacija vaskularnih endotelnih stanica. Najbolji do sada okarakteriziran inhibitor kaspaza je XIAP (eng. *X-linked inhibitor of apoptosis*), a sadrži čak tri domene BIR kojima blokira aktivnost kaspaza. Nadalje, proteini XIAP i Survivin mogu djelovati zajedno te na ovaj način još više proširiti svoj funkcionalni repertoar (Mohamed et al., 2017).

Postoje i IAP-antagonisti, odnosno proteini koji reguliraju aktivnost proteina IAP i djeluju pro-apoptotički. Neki od najbolje okarakteriziranih IAP-antagonista u sisavaca su Smac/Diablo i HtrA2/Omi. Oni djeluju na proteine IAP tako što stupaju u fizički kontakt s njima (posjeduju visoko konzervirane regije IBM, eng. *IAP Binding Motif*) koje se specifično vežu na domene BIR proteina IAP te tako onemogućuju vezanje kaspaza i promoviraju apoptozu. Mnogi događaji u stanici, poput oštećenja DNA, promoviraju otpuštanje IAP-antagonista u citosol koji tada blokiraju aktivnost proteina IAP vezanjem na njihove domene BIR ili promoviranjem njihove auto-ubikvitinizacije. Tumor supresor gen *XAF1* (eng. *XIAP-associated factor*) djeluje kao IAP-antagonist, sekvestrira XIAP u jezgri i suprimira njegovo anti-kaspazno djelovanje. Tumorigeneza je favorizirana kada je razina ekspresije gena *XIAP* puno veća u odnosu na razinu ekspresije gena *XAF1*, jer se na taj način izbjegava apoptoza. Tumor supresor p53 utječe na pojačanu ekspresiju gena *HTRA2*, što je jedan od primjera na koji p53 promovira apoptozu i suprimira karcinogenezu. Također, važno je spomenuti i interakciju između proteina XAF1 i p53. Naime, u zdravim stanicama protein p53 djeluje transkripcijskom represijom na gen *XAF1* kako se ne bi duplicirala njihova funkcija. Naime, protein XAF1 inducira fosforilaciju proteina p53 ukoliko u stanici postoji oštećenje DNA, čime dolazi do nakupljanja proteina p53 u jezgri i njegove aktivacije. Ovo ukazuje na funkciju proteina XAF1 kao promotora p53-posredovane apoptoze u tumorskim stanicama. Povećanje ekspresije gena *XAF1* može se iskoristiti u protutumorskoj terapiji, posebice u tumora u kojima je ekspresija gena divljeg tipa *P53* smanjena (Mohamed et al., 2017).

Porodica proteina inhibitora apoptoze IAP u stanicama su glavni regulatori kaspazne aktivnosti te tako i stanične smrti. Proteine IAP smatramo glavnim krivcima za izbjegavanje

apoptoze, što je jedna od karakteristika nastanka tumora. Visoka ekspresija proteina IAP zabilježena je u raznim slučajevima malignih tumora što je takve tumore okarakteriziralo kao rezistentne na kemoterapiju i radioterapiju. Upravo iz ovog razloga smatramo ih izuzetno važnim metaama u protutumorskoj terapiji (Mohamed et al., 2017).

#### 4.4. Warburgov u inak

Warburgov u inak, iz engleskog *Warbourg effect*, (dobio je naziv prema njema kom Nobelovcu Ottu Heinrichu Warburgu), opisuje dva nepovezana biokemijska procesa, jedan vezan uz fiziologiju bilja, a drugi uz onkologiju (Liberti i Locasale, 2016). U onkološkom smislu Warburgov u inak još se naziva i aerobna glikoliza. Naime, ve ina zdravih ljudskih stanica dobiva veliku koli inu energije u stanicama (ATP-a) vršenjem oksidacijske fosforilacije. U tumorskim stanicama unos glukoze i vršenje glikolize kao primarnog metaboli kog puta za dobivanje energije udeseterostru eno je u odnosu na ostale zdrave stanice. Ve ina tumorskih stanica živi u hipoksi nim uvjetima zato jer nedostaje mreža kapilara (na samome po etku proliferacije tumora još nije došlo do angiogeneze) koje bi tumorskim stanicama konstantno dopremale kisik. U ovakvim uvjetima bez kisika, glikoliza je primarni metaboli ki put za dobivanje ATP-a. Kako bi stvorile jednaku koli inu ATP-a kao i zdrave stanice koje mogu vršiti oksidacijsku fosforilaciju (jer imaju zdrave mitohondrije i dostupan kisik), tumorske stanice moraju uzimati puno više glukoze. Naime, od jedne molekule glukoze glikolizom se može dobiti 2 ATP-a, a oksidativnom fosforilacijom oko 30 ATP-a (Nelson i Cox, 2013). Tako er, u tumorskim stanicama pH je snižen jer se konstantno stvara laktat (mlije na kiselina) kao kona ni produkt glikolize. U tumorski mikrokoliš difundiraju  $H^+$  ioni koji dodatno pridonose invazivnosti tumora, a dokazano je da nastali laktat potpomaže polarizaciji tkivnih makrofaga, tip M1 u M2 (Liberti i Locasale, 2016). U ranim koracima razvoja tumora aktivira se ekspresija gena za protein HIF-1 (eng *hypoxia-inducible transcription factor 1*) koji stimulira produkciju najmanje 8 glikoliti kih enzima i glukoznih transportera koji ne ovise o inzulinu (npr. GLUT1 i GLUT3). Protein HIF-1 tako er stimulira ekspresiju peptidnog hormona VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*) koji poti e rast krvnih žila prema tumoru (angiogeneza). Nadalje, u ve ini tumora mutiran je tumor supresorski gen *P53* iji proteinski produkt sudjeluje u sintezi i sklapanju mitohondrijskih proteina važnih za transportni lanac elektrona. S obzirom da je gen *P53* mutiran u ve ini tumora, defektan je i

transportni lanac elektrona pa tumori moraju preživljavati na glikolizi kao primarnom izvoru energije (Nelson i Cox, 2013).

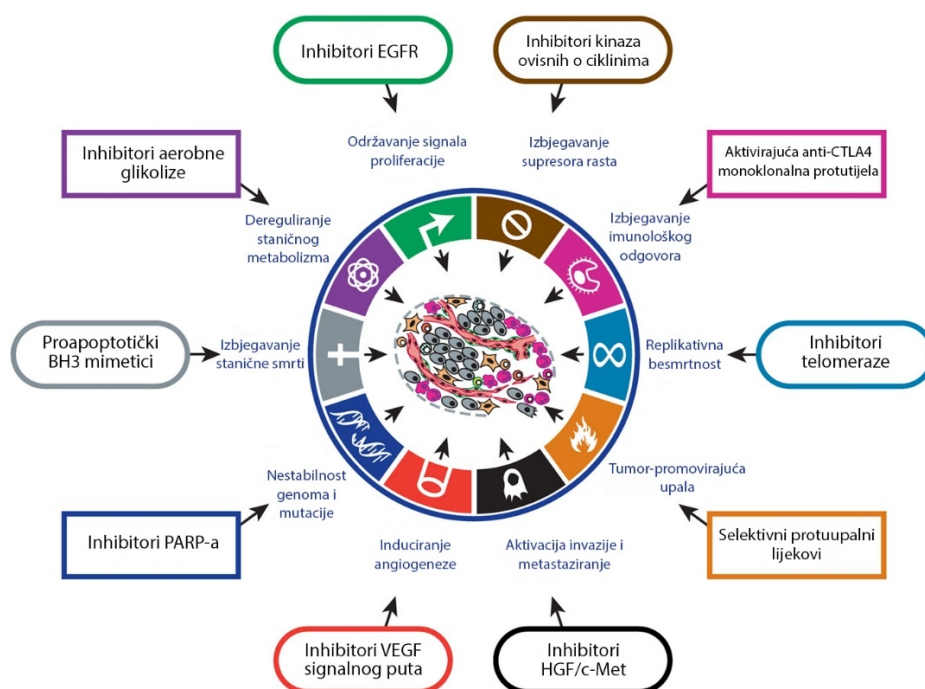
Oslanjanje tumora na glikolizu kao primarni izvor energije daje mogućnost za razvoj protutumorskih lijekova. Kemoterapeutici poput 2-deoksiglukoze, lonidamina i 3-bromopiruvata djeluju kao inhibitori heksokinaze (primarni enzim u glikolitičkom putu) i sprječavaju nastanak glukoza-6-fosfata. Osim što blokiraju glikolizu blokiraju i put pentoza-fosfata jer je glukoza-6-fosfat ishodišna molekula za nastanak pentoza-fosfata. Pentoza-fosfati su esencijalni za sintezu DNA i RNA, a bez njih stanica se ne može dijeliti i rasti. Tako er imatinib (Gleevec) inhibira tirozin kinaze, a sprječava povećanu sintezu heksokinaze (Nelson i Cox, 2013).

Visoka stopa glikolize ima svoju primjenu i u medicinskoj dijagnostici. Naime, relativne brzine kojima tkiva uzimaju glukozu mogu se iskoristiti kao pokazatelji mjesta na tijelu gdje se razvija tumor. U pozitronskoj emisijskoj tomografiji (PET) pacijenti dobivaju injekcijsku otopinu radioaktivno označenog analoga glukoze (2-fluoro-2-deoksi-glukoza, FdG) koji može ući u stanice, ali se ne može metabolizirati. S obzirom na količinu apsorbiranog i nakupljenog radioaktivno obilježenog fluora, posebnim detektorima postavljenim oko tijela detektira se i lokalizira tumorsko tkivo (Nelson i Cox, 2013).

## 5. IZAZIVANJE STANI NE SMRTI U TUMORSKIM STANICAMA

Nastanak i razvoj tumora ogroman je problem danas u svijetu. Prema istraživanju iz 2012. godine Meunarodne agencije za istraživanje tumora GLOBOCAN, u svijetu je te godine zabilježeno: 14.1 milijuna novih slučajeva nastanka tumora, 8.2 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih tumorom i 32.6 milijuna ljudi koje žive s tumorom (sa postavljenom dijagnozom trajanja života 5 godina) ([www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)).

Za pravilno modeliranje protutumorske terapije potrebno je poznavati osnovna obilježja tumorskih stanica, mehanizme nastanka tumora, signalne puteve i metabolizam tumorskih stanica te tumorski mikrookoliš. Neka od osnovnih obilježja tumorskih stanica koja su cilj protutumorske terapije su: nestabilnost genoma i mutacije, odupiranje staničnoj smrti, dereguliranje staničnog metabolizma, održavanje proliferativnih signala, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje imunološke reakcije, replikativna besmrtnost, upala koja je tumor-promovirajuća, indukcija angiogeneze, aktivacija invazivnosti i metastaziranje. S obzirom na dosadašnja saznanja znanstvene zajednice o ovim obilježjima tumorskih stanica Hanahan i Weinberg predložili su mehanizme za koje smatraju da bi zaustavili rast tumora ili izazvali smrt tumorskih stanica, a koji su već upotrijebljeni ili su tek u stadiju razvoja kao protutumorski lijekovi (**Slika 5.**) (Hanahan i Weinberg, 2011).



**Slika 5.** Ciljevi u protutumorskoj terapiji s obzirom na glavna obilježja tumora. Preuzeto iz Hanahan i Weinberg, 2011. Prilagođeno na Hrvatski u programu Adobe Photoshop CC 2017.



## 5.1. Klasične metode liječenja

Jedna od najstarijih metoda liječenja tumora je kirurško odstranjivanje tumorskog tkiva. Ova metoda esto se koristi i u dijagnostici (biopsija tkiva) i za rekonstrukciju (primjerice kod tumora dojke). Kirurgija nije uvijek idealna metoda liječenja osobito ako je riječ o tumorima koji su se razvili na teško operativnim mjestima ili ako je riječ o tumorima hematološkog tkiva. Operativnim zahvatom važno je odstraniti i dio zdravog tkiva oko tumora kao i najbliže limfne čvorove u slučaju da je došlo do nastanka metastaza. Kirurzi trebaju biti osobito oprezni kako ne bi došlo do gubitka tumorskih stanica iz primarnog tumorskog tkiva koje bi izazvale širenje tumora na nova tkiva (širenje sluznicom i trbušnom šupljinom, ascitesni tumori) ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Esto korištene protutumorske terapije su kemoterapija i radioterapija. Glavna meta ovakvih lijekova je uništiti proliferirajuće stanice. No, osim tumorskih stanica u organizmu postoje i zdrave proliferirajuće stanice poput stanica koštane srži, spolnih stanica, probavnog epitela te stanica kose i kože koje se također dijele pa ovakvi oblici terapije utječu i na njih. Stoga kažemo kako su kemoterapija i radioterapija nespecifični oblici liječenja. Kemoterapija i radioterapija imaju za glavni cilj naštetiti stanicama za vrijeme različitih faza staničnog ciklusa (najčešće je riječ o S fazi, ali nisu svi kemoterapeutici ovisni o fazama staničnog ciklusa). Esta meta protutumorskih lijekova su enzimi topoizomeraze tipa II. Topoizomeraze su važne za održavanje strukture kromatina u jezgri (struktura je bitna zbog procesa kao što su replikacija, popravak DNA i ekspresija gena gdje je DNA podzavijena, te dioba stanica pri kojoj je stupanj kondenzacije kromatina i do 10000 puta veći u odnosu na stanice koje nisu u fazi diobe). U tumorskim stanicama koje se nekontrolirano dijele, razina ekspresije topoizomeraza je povećana. Protutumorski lijekovi koji inhibiraju rad topoizomeraza djeluju na način da dozvoljavaju puknuće u DNA lancima, ali ne i njegov popravak. Naime, topoizomeraze su vrlo važne za relaksiranje pozitivnih superzavoja u DNA i povezani su sa podzavijenom DNA u kromatinu. Primjer ovakvih lijekova otkrivenih još 1990-ih godina su irinotekan (Campto) korišten za liječenje tumora kolona i topotekan (Hycamtin) tumora na jajnicima. Ljudska topoizomeraza tipa II je meta protutumorskih lijekova poput doksorubicina (Adriamycin), etopozida (Etopophos) i elipticina. Ovi lijekovi povećavaju razinu oštećene DNA u tumorskim stanicama, iako zdrava tkiva također mogu biti zahvaćena njihovim djelovanjem. To dovodi do još veće toksičnosti i nuspojava koje se moraju premostiti tijekom terapije. Topoizomeraze su i danas istaknuta meta u istraživanjima tumora (Nelson i Cox, 2013).

esto se koriste različite kombinacije kemoterapeutika, koji imaju različite mete u stanicama ili djeluju u različitim fazama staničnog ciklusa kako bi se poboljšao citotoksičnost/citostatičnost u inak na tumorske stanice. No kod uporabe više različitih kemoterapeutika (kombinirana kemoterapija) može se javiti rezistencija na kemoterapeutike, koju još nazivamo križna rezistencija (eng. *multidrug resistance*, *MDR*). Postoje različiti molekularni mehanizmi križne rezistencije u stanici, poput onih koji onemogućuju nakupljanje lijeka u stanici do onih koji dokidaju apoptozu koju je lijek izazvao. Najviše istraživani mehanizmi kojima tumorska stanica ostvaruje rezistenciju su: i) aktivacija transmembranskih proteina koji izbacuju različite kemijske tvari (u slučaju kemoterapije izbacuju lijek) iz stanice (P-glikoprotein je najpoznatija efluksna pumpa, PGP-pumpa), ii) aktivacija enzima glutation detoksifikacijskog sustava i iii) promjena gena i proteina uključenih u kontrolu apoptoze (osobito p53 i Bcl-2) (Stavrovskaya, 2000 i [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org)).

## 5.2. Nove metode liječenja tumora - ciljana protutumorska terapija

Ciljane tumorske terapije poput monoklonskih antitijela i inhibitora male molekularne mase značajno su promijenile liječenje tumora u posljednjih 20-ak godina. Ciljanu tumorsku terapiju pacijenti obično bolje podnose nego primjerice kemoterapiju, iako se prilikom ovakvih vrsta protutumorske terapije također mogu pojaviti nuspojave. Ciljana tumorska terapija omogućila je individualan pristup pacijentu i dizajn osmišljen prema obilježjima njegovog tumorskog tkiva. Monoklonska antitijela (poprilično su velike molekule oko 150000 Da), vežu se na tumorsku stanicu izvana, odnosno na specifičan stanični receptor. Dobar primjer uspješno razvijene terapije monoklonskim antitijelima je Herceptin (Trastuzumab) korišten za liječenje tumora dojke. Naime, Herceptin je monoklonsko antitijelo sintetizirano da se veže na HER2 receptore (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*) koji su prekomjerno izražene tirozin kinaze na tumorskim stanicama dojke. Ovakvi HER2 receptori signaliziraju proliferativne signale i inhibiraju apoptozu stanice. Vezanjem Herceptina proliferativni signali se blokiraju i stanica se označava kao meta imunološkog sustava za uništenje aktiviranjem NK stanica i komponenti komplementa (Gerber, 2008).

Nasuprot njima, inhibitori malih molekularnih masa, zbog svoje veličine (oko 500 Da) mogu ući u stanicu gdje djeluju tako što blokiraju neki signalni put i narušavaju njegovu kaskadu vežući se na neku od molekula tog signalnog puta. Inhibitori male molekularne mase

djeluju tako što najčešće interferiraju s tirozin kinazama. Mnogi onkogeni i tumor supresorski geni kodiraju za protein kinaze ili za proteine koje nalazimo u uzvodnim putevima od protein kinaza. Specifični inhibitori ovakvih proteinskih kinaza pokazali su se vrijednim lijekovima u borbi protiv tumora. Potrebno je jako dobro poznavati trodimenzionalnu strukturu proteinskih kinaza, osobito oko ATP-veznog mjesta, u koje se se vezati lijek inhibitor kinaze. Također, potrebno je poznavati jedinstvene aminokiselinske ogranke oko ATP-aznog mjesta kako bi se lijek specifično vezao. Primjeri ovakvih lijekova su imatinib mezilat (kod ranog stadija kronične mijeloidne leukemije) koji inhibira konstantno aktivnu tirozin kinazu što je produkt translokacije kromosoma 9 i 22 (tzv. Philadelphia kromosom), erlotinib kod tumora na plućima, sunitinib kod gastrointestinalnih stromalnih tumora i drugi. Inhibitori proteinskih kinaza djeluju tako što onemogućuju signalni put koji potiče staničnu proliferaciju i tumorski razvoj (Gerber, 2008, Nelson i Cox, 2013).

Svaka od ovih terapija ima svojih prednosti, ali i nedostataka, primjerice monoklonska antitijela mogu se vezati i na receptore u zdravim stanicama te izazvati štetu i najrazličitije nuspojave baš kao i klasični kemoterapeutici, ali ne prolaze kroz hepatički metabolizam i ne djeluju s drugim lijekovima. Stoga je važno dobro ispitati djelovanje svakog novog lijeka prije nego dospije na tržište, njegovu biotransformaciju, farmakologiju i pratiti odgovor pacijenata na lijek.

Kako protutumorske terapije sve više napreduju, razvoj novih do sada nepoznatih tumora postaje sve veći problem. Za što bolji dizajn protutumorske terapije kojoj je primarni cilj uništiti tumorske stanice potrebno je dobro poznavati načine na koje stanica može umrijeti kao i mehanizme kojima ona ostvaruje rezistenciju na staničnu smrt i nekontroliranu proliferaciju. Dakle, molekularni mehanizmi razvoja tumora usko su povezani sa mehanizmima stanične smrti i ostaju važna meta u istraživanju tumora i kreiranju protutumorske terapije.

## 6. SAŽETAK

Višestani ni eukariotski organizmi imaju reguliran proces stani ne smrti. Ukoliko je stani na smrt onemogu ena ona može biti uzrok nastanka razli itih bolesti pa tako i tumora. Apoptoza ili programirana stani na smrt je proces koji se zasniva na aktivnosti cisteinskih aspartat-specifi nih proteaza koje nazivamo kaspazama. Osim ovog oblika stani ne smrti poznajemo i druge ne-apoptoti ke oblike stani ne smrti (autofagija, nekroptoza, senescencija, anoikis, mitoti ka katastrofa i drugi) koji se mogu biti prisutni neovisno o apoptozi, ali i ukoliko je apoptoza iz nekog razloga onemogu ena. Jedna od glavnih karakteristika tumorskih stanica jesu poreme aji u putevima stani ne smrti. U ljudi dolazi do nastanka tumora kada geni koji reguliraju normalnu stani nu diobu (proto-onkogeni i tumor supresorski geni) postanu disfunkcionalni, aktivirani u krivo vrijeme ili izmijenjeni. Porodica onkogeni *MYC* klju na je u tumorigenezi i izmijenjena u 70% humanih tumora kada gen *MYC* ima konstitutivnu ekspresiju. Proteinski produkti ovog gena igraju klju nu ulogu u progresiji stani nog ciklusa, apoptozi i stani noj transformaciji. lanovi porodice proteina Bcl-2 prekomjerno su ekspimirani u tumorskim stanicama te induciraju transformaciju blokiranjem apoptoze. Nadalje, visoka ekspresija IAP proteina zabilježena je u raznim slu ajevima malignih tumora, što je takve tumore okarakteriziralo rezistentnima na kemoterapiju i radioterapiju. U ve ini slu ajeva cilj je eliminirati tumorske stanice reaktivacijom puteva stani ne smrti. To možemo u initi ciljanjem na anti-apoptozne proteine kao što su Bcl-2 i skupina proteina IAP ili reaktivacijom p53 odgovora. Na ini na koje stanica može umrijeti kao i mehanizmi kojima ostvaruje nekontroliranu proliferaciju i rezistenciju na stani nu smrt važna su meta u istraživanju tumora i kreiranju protutumorske terapije.

## 7. SUMMARY

One of the main characteristics of multicellular eukaryotic organisms is that they have regulated process of cell death. In the cases when cell death is blocked it can trigger many different diseases as well as tumour formation. Apoptosis or programmed cell death is a process based on the activity of aspartate-specific cysteine proteases called caspases. Except for apoptosis, there are several other types of non-apoptotic cell death (autophagy, necroptosis, senescence, anoikis, mitotic catastrophe and others) which can occur independently of apoptosis or in cases when apoptosis is blocked. One of the main characteristics of tumour cells is deregulated cell death. Tumour development in humans is activated when genes responsible for regulation of cell division (proto-oncogenes and tumour-suppressor genes) become dysfunctional, activated in a wrong time or modified. *MYC* family of oncogenes is crucial in tumorigenesis and it's modified in 70% of human tumours when this gene has constitutive expression. Protein products of *MYC* oncogenes are of high importance in the progression of cell cycle, apoptosis and tumour transformation. Furthermore, members of the Bcl-2 family of proteins are overexpressed in tumour cells and induce transformation by blocking apoptosis. Likewise, overexpression of IAP family members is noticed in different cases of malignant tumours enabling their resistance to chemotherapy and radiotherapy. In most cases, the aim of the therapy is to eliminate tumour cells reactivating the cell death pathways. We are able to do that by targeting anti-apoptotic proteins as Bcl-2 and IAP family members or reactivating p53 response. Pathways regulating cell death, as well as mechanisms of uncontrolled proliferation and drug resistance are a valuable target for cancer research and anti-tumour therapy design.

## LITERATURA

Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. and Vandenabeele, P., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), p.135.

Berry, D., 2007. Molecular animation of cell death mediated by the Fas pathway. *Science Signaling*, 2007(380), pp.tr1-tr1.

Canepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F. and Ogara, M.F., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB life*, 59(7), pp.419-426.

Cassier, P.A., Castets, M., Belhabri, A. and Vey, N., 2017. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *British journal of cancer*, 117(8), p.1089.

Coqueret, O., 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. *Trends in cell biology*, 13(2), pp.65-70.

de Bruin, E.C. and Medema, J.P., 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer treatment reviews*, 34(8), pp.737-749.

Duke, R.C., Ojcius, D.M. and Young, J.D.E., 1996. Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, 275(6), pp.80-87.

Gerber, D.E., 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3).

Gewirtz, D.A., Holt, S.E. and Grant, S. eds., 2007. *Apoptosis, Senescence and Cancer*. Springer Science & Business Media.

Green, D. and Kroemer, G., 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends in cell biology*, 8(7), pp.267-271.

Grossmann, J., 2002. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis—Anoikis”. *Apoptosis*, 7(3), pp.247-260.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), pp.646-674.

Henderson, C., Mizzau, M., Paroni, G., Maestro, R., Schneider, C. and Brancolini, C., 2003. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), pp.12579-12589.

Hyman, B.T. and Yuan, J., 2012. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), pp.395-406.

Ianzini, F. and Mackey, M.A., 2007. Mitotic catastrophe. In *Apoptosis, senescence, and cancer* (pp. 73-91). Humana Press.

Kaufmann, S.H., 2007. The intrinsic pathway of apoptosis. In *Apoptosis, Senescence, and Cancer* (pp. 3-30). Humana Press.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), p.239.

Liberti, M.V. and Locasale, J.W., 2016. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), pp.211-218.

Losos, J.B., 2013. *The Princeton guide to evolution*. Princeton University Press.

Maclean, K.H. and Cleveland, J.L., 2007. Interactions Between Myc-and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Cancer. In *Apoptosis, Senescence, and Cancer* (pp. 223-241). Humana Press.

Marquez, R.T. and Xu, L., 2012. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *American journal of cancer research*, 2(2), p.214.

Marzo, I., Brenner, C. and Kroemer, G., 1998. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 52(6), pp.248-251.

Mohamed, M.S., Bishr, M.K., Almutairi, F.M. and Ali, A.G., 2017. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, 22(12), pp.1487-1509.

Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. and Yasuhiko, Y., 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), pp.34287-34294.

Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2013. *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). New York: W.H. Freeman.

Okada, H. and Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), pp.592-603.

Paoli, P., Giannoni, E. and Chiarugi, P., 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3481-3498.

Ramirez, R.D., 2007. Overview of Senescence. In *Apoptosis, Senescence, and Cancer* (pp. 145-157). Humana Press.

Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K., 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical pharmacology*, 66(8), pp.1453-1458.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S. and Green, D.R., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 144(2), pp.281-292.

Stavrovskaya, A.A., 2000. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHIMIYA*, 65(1), pp.95-106.

Tait, S.W., Ichim, G. and Green, D.R., 2014. Die another way–non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*, 127(10), pp.2135-2144.

Weiss, R.H., 2003. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer cell*, 4(6), pp.425-429.

Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X.C., Huang, W., Yan, C., Scheres, S.H. and Shi, Y., 2015. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c-and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & development*, 29(22), pp.2349-2361.



## **MREŽNI IZVORI**

URL 1: [www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr) (Pristupljeno 18. travnja 2018.)

URL 2: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) (Pristupljeno 18. travnja 2018.)

URL 3: [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org) (Pristupljeno 18. travnja 2018.)